

**Results.** According to results of long-term researches of 394 collective sort standards of alfalfa crop of various ecogeographical origin, the genotypes that are tolerant to the soil acidity with the relatively high feeding and seed productivity are mentioned. With the usage of mentioned in recent years collective sort standards the hybrid material has been created in the amount of 87 populations and the estimation of it has been done. Among them there are 7 hybrid populations (F<sub>2</sub>) which exceed the average (in 2011–2012) the standard sort Syniukha as to the crop of the dry material 2–8 and seeds 8–58 %. **Conclusions.** The received results of investigation prove the high estimation as genetic sources tolerant signs to the higher soil acidity of sort standards Zhydrune (Litva), Vika (Denmark), Yaroslavna and Syniukha (Ukraine), Mega (Switzerland) and the perspective outgoing material hybrid populations received with their participation.  
*Key words:* alfalfa crop, selection, soil acidity.

УДК 633.15:631.524:575.113:542.1

БУКРЄЄВА Н.І., ДОМЕНЮК В.П., БЕЛОУСОВ А.О., СОКОЛОВ В.М., СИВОЛАП Ю.М.

*Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насінництва та сортовивчення, Україна, 65036, м. Одеса, вул. Овідіопольська дорога, 3, e-mail: natastor@rambler.ru*

### МОЛЕКУЛЯРНІ МАРКЕРИ В ПРОГНОЗУВАННІ ГЕТЕРОЗИСУ У КУКУРУДЗИ

На сучасному етапі однією з головних задач селекції кукурудзи стає вирішення проблем як використання гетерозису так і поліпшення якості врожаю. Використання досягнень молекулярної генетики і, перш за все, ДНК-маркерів поглиблює знання про організацію та мінливість геному цієї культури і дозволяє вдосконалити селекційний процес та підвищити ефективність селекції і насінництва. Отже, добір конкретних індивідуумів з бажаними ознаками є фундаментальною основою селекції рослин.

Добір звичайно включає в себе візуальну оцінку селекційної популяції за одним або кількома ознаками в польових або тепличних випробуваннях (наприклад, агрономічні ознаки, стійкість до хвороб і толерантність до стресів) або лабораторні випробування за допомогою хімічних тестів (наприклад, якість зерна). Мета селекції рослин – об'єднання якомога більше бажаних комбінацій генів у нових сортів. При використанні загальноприйнятого методу педігрі добір бажаних рослин починається в ранніх генераціях за ознаками вищої спадковості. Однак, для ознак з низькою спадковістю, добір часто відкладено, поки лінії стануть більш гомозиготними в пізніших поколіннях (F<sub>5</sub> або F<sub>6</sub>). Цей процес часозатратний (5–10 років для визнання елітних ліній) і ресурсовитратний.

Чисельність і склад популяції є важливим чинником для селекційних програм. Чим більше число генів, що сегрегують в популяції, тим більший розмір популяції потрібний для виявлення конкретних комбінацій генів. В

типових селекційних програмах зазвичай вирощують сотні або навіть тисячі популяцій і кілька тисяч або мільйони окремих рослин. Масштаби і складність добору, кількість і розмір популяцій в традиційних селекційних програмах потребують нових інструментів, до яких з впевненістю можна віднести добір за допомогою маркерів (Marker-Assisted Selection, MAS). Добір за молекулярними маркерами має величезний потенціал для підвищення ефективності та точності звичайної (традиційної) селекції рослин.

Успіхи гетерозисної селекції кукурудзи значною мірою залежать від генетичного різноманіття вихідного матеріала, яке обумовлює фізіологічний потенціал даної культури і сприяє створенню високоврожайних, адаптованих до певних природних зон гібридів з ефективними системами захисту, підвищеною врожайністю та покращеною якістю зерна. Наявність зв'язку між генетичною дивергенцією батьківських форм і гетерозисом простих гібридів, продемонстроване Моллом з співробітниками в 1962 р. [1], є початком аналізу кореляції між врожаєм зерна F<sub>1</sub>-гібридів і генетичними дистанціями, розрахованими з використанням різних маркерів [2, 3]. У 1991 р. здійснено теоретичні розрахунки лінійної кореляції між показниками міжлінійних генетичних дистанцій, отриманими на основі інформації про маркерні локуси, та гетерозисом у відповідних F<sub>1</sub>-гібридів [4]. Автори зробили висновок про те, що прогнозування гетерозиса F<sub>1</sub>-гібридів на основі маркерних локусів може бути більш ефективним, якщо маркери

добирають за їх спорідненістю до алелів, пов'язаних з бажаними гетерозисними ознаками.

Основою маркування локусів кількісних ознак (Quantitative Trait Loci, QTL) [5, 6], до яких відносяться і так звані гетерозисні ознаки, є оцінка достовірності різниці між «селективною вагою» алелів певного маркерного локусу. Такий підхід забезпечує статистично коректне ДНК-маркування локусу кількісної ознаки й визначає селекційну цінність маркерних алелів. У зв'язку з цим у СГІ-НЦНС закладений досвід для розробки системи селекційного добору цінних генотипів на підставі молекулярного маркування QTL.

**Мета** наших досліджень полягала у визначенні маркуючої здатності поліморфних локусів ДНК, що перевіряється у двох послідовних генераціях для встановлення істинності зв'язку між маркером і QTL. Алелі маркерного локусу та QTL повинні мати досить близьку локалізацію у групі зчеплення і не відокремлюватися кросінговером, саме це є підставою для остаточного визнання цього локусу маркерним. Порівняння «селективної ваги» певних маркерів у двох послідовних генераціях за умови відтворення їх зв'язку з QTL дозволяє остаточно визначити «якість» маркерів.

#### **Матеріали і методи**

Вихідний матеріал – лінії кукурудзи ГК 26, Мо 17, сегрегуюча популяція (ГК 26 х Мо 17) F<sub>2</sub> і лінії-тестери (лінії, які використано у якості запилювачів на ділянках гібридизації з материнськими рекомбінантними інбредними лініями (PIJ) Одеська 308 МВ, Одеська 221 МВ і Одеська 329, надані лабораторією генетико-біотехнологічних методів селекції кукурудзи СГІ-НЦНС. Інбредні лінії суттєво різняться за основними морфобіологічними ознаками і належать до різних гетерозисних груп – Iodent, Lancaster, Mindszenpuszta, відповідно, а лінії Одеська 221 МВ і Одеська 329 відносять до окремих гетерозисних груп, які утворюють з лініями інших груп високогетерозисні гібриди.

Схрещування рекомбінантних ліній популяцій F<sub>4</sub>, F<sub>6</sub> з тестерами та сортовипробування отриманих гібридів проводили на експериментальних базах СГІ-НЦНС «Дачна» та «Новоселівське» протягом двох років. Гібриди з відповідними стандартами висівали рендомізованими блоками у трикратній повторності. Оцінювали врожай зерна в розрахунку на 14 % вологості, статистичну обробку даних проводили згідно загальнопоширених методів [7]. Рівень конкурсного

гетерозису визначали за формулою Peter and Frey у викладі Зенишевої Л.С. [8]:

$$H_k = \frac{F_1 - st}{st} 100\%$$

де F<sub>1</sub> – урожайність гібриду; st – урожайність стандартного гібриду.

Для детекції поліморфізму ДНК використано полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) з RAPD-, ISSR- та SSR-праймерами. ДНК виділяли з листків кукурудзи із застосуванням цетавлону. Умови ампліфікації ДНК оптимізовані для приладу MJ Research (PTC-200). Для ампліфікації використали оптимальні температурні режими в залежності від типу праймерів.

Електрофоретичну оцінку фрагментів ампліфікації проводили у 4 % агарозному та 10 % поліакриламідному гелях. Документували отримані електрофореграми за допомогою відеосистеми VDS (Pharmacia Biotech, США). Молекулярну масу поліморфних фрагментів ДНК підраховували за допомогою комп'ютерної програми «Image Master 1D Elite» згідно стандарту pUC19/MspI, pBR322/MspI та л/PstI (Fermentas, Латвія).

Побудову дендрограм та розрахунок генетичних дистанцій провадили за допомогою багатомірних статистичних методів пакета програм фірми StatSoft, Inc., (США) STATISTICA (V 8.0) з використанням критерія агломерації ближчого сусіда (Single linkage), який базується на матриці даних попарних генетичних дистанцій – кластери об'єднуються за мінімальною відстанню між двома ближчими сусідами при кожному циклі підрахунку. У якості функції відстані використовували евклідову метрику. Кореляційний аналіз провадили з застосуванням стандартної комп'ютерної програми «EXCEL» та пакета комп'ютерної програми «StatPlus».

#### **Результати та обговорення**

Успадковування кількісних ознак вивчали на гібридних популяціях (ГК26 х Мо17) F<sub>2</sub> та F<sub>3</sub>. Загалом вивчено мінливість 18 агрономічно цінних ознак, серед яких ознаки, що формують габітус рослини, ознаки морфології волоті, складові продуктивності та біохімічні. Для детекції молекулярно-генетичного поліморфізму у батьківських ліній використано 15 SSR-, 20 RAPD- та 18 ISSR-праймерів. Орієнтовні дані маркування отримано на поколінні F<sub>2</sub>, підтвердження маркуючої здатності – на F<sub>3</sub>. Маркуюча здатність поліморфних локусів, тобто кількість ознак, маркованих одним локусом,

коливалася від 1 (*phi064\_86-79*, P 21\_612(+)) – «висота прикріплення качана»; *isp 5\_1008(+)*, *isp 5\_378(-)*, *isp 7\_503(+)*, *isp 13\_525(-)*, P 21\_564(+)) – «глибина зерна»; *isp 7\_797(+)* – «маса 100 зерен»; *isp 13\_330(-)* – «вміст білку»; *isp 13\_236(+)* – «волога зерна») до 4 (*nc030\_108* – «висота рослини», «висота прикріплення качана», «ширина листа», «індивідуальна продуктивність»).

Кількість маркерів, що припадає на одну ознаку, змінювалася від 1 («волога зерна» – *isp 13\_236(+)*, «вміст білку» – *isp 13\_330(-)*, «довжина волоті» – *phi 083\_178*, «ширина листа» – *nc 030\_108*) до 9 («глибина зерна»). За цим показником найбільш маркованою можна вважати групу ознак продуктивності, найменш – групу біохімічних ознак.

У локусів, що маркують декілька ознак, виявлено два типа інформативності: 1) маркерний алель однаковий, наприклад, локус *isp 5\_950* маркує ознаки «глибина зерна» та «індивідуальна продуктивність» одним алелем «aa», тобто у таких генотипів більш високі значення даних ознак. Такий тип маркування характерний також для локусів: *phi061*, *isp 5\_511*, *isp 5\_345*, *isp 7\_466*. 2) маркерні алелі різні, наприклад, локус P 21\_1016 маркує ознаки «довжина листа» і «глибина зерна» різними алелями, «aa» та «A-» відповідно. За таким типом маркують локуси: *nc030*, *phi083*. Маркерами можна вважати певні алелі цих локусів, оскільки спостерігається нерівновага за зчепленням між ними та QTL, що визначають відміни у прояві досліджених ознак [9–12].

Отже, розроблено технологію прогнозування рівня розвитку кількісних ознак у популяціях кукурудзи на підставі їх зв'язку з ДНК-маркерами. Отримані результати пропонуються використовувати для індивідуального генотипового прогнозу розвитку певних агрономічних ознак, що дозволить значно прискорити добір потрібного матеріалу вже за рік, починаючи з F<sub>2</sub>, та для моделювання добору генотипів з високим рівнем розвитку ознак у субпопуляціях (сім'ях) за маркерними алелями, що дозволить генетично поліпшувати базові популяції кукурудзи і використовувати їх за вихідний матеріал для гетерозисної селекції.

З використанням 47 пар SSR-праймерів проведено порівняльний аналіз геномної ДНК елітних ліній ГК 26 та Мо 17, на основі яких отримані сегрегуюча популяція F<sub>2</sub>, а в результаті подальшого самозапилення – популяції РІЛ (ГК 26 x Мо17) F<sub>4</sub>, F<sub>6</sub>. Добрано 10 пар поліморфних у

вихідних ліній ГК 26 і Мо 17 локусів: *nc030*, *phi061*, *phi064*, *phi083*, *phi031*, *phi044*, *phi057*, *phi084*, *phi080*, *phi112* на восьми з 10 хромосом.

На основі SSR-аналізу, у рамках вивчення успадкування кількісної ознаки «Урожай зерна» у пізніх генераціях популяції кукурудзи розроблено модельну схему прискорення селекційного процесу на основі поєднання традиційних методів селекції з ДНК-технологіями, яка показує принципову можливість прогнозування добору кращих генотипів батьківських форм для отримання високогетерозисних гібридів кукурудзи.

У основі розробки лежить принцип добору в популяціях тільки найбільш цінних батьківських генотипів для отримання високопродуктивних гібридів за рахунок використання генетичних дистанцій як інструменту для групування генотипів з подібною ідіоплазмою. Реалізація принципу відбувається у зменшенні обсягів робіт і ресурсних витрат у результаті прогнозування за генетичними дистанціями потенційно продуктивних генотипів в межах популяції на ранніх етапах селекційного процесу та зменшення кількості схрещувань для польової оцінки.

Ефективність схеми доведено експериментальним моделюванням ДНК-прогнозу добору генотипів у популяціях кукурудзи (ГК 26 x Мо17) F<sub>4</sub>, F<sub>6</sub> для отримання високогетерозисних гібридів. У процесі моделювання проводили формування класів у популяції РІЛ F<sub>4</sub>, F<sub>6</sub> за генетичною дистанцією відносно ліній-тестерів Одеська 329 і Одеська 308 МВ. Основою добору цінних генотипів у популяціях РІЛ є визначення індивідуальних генетичних дистанцій (ГД) для кожної РІЛ відносно кожної з ліній-тестерів та кластерний аналіз популяції РІЛ за розміром ГД. За генетичним профілем РІЛ і тестерів формували базу даних популяції та оцінювали внутрішньогрупові ліміти дистанцій. Визначали групи ліній: споріднені – з мінімальним значенням ГД, середнього віддалення та групи максимального генетичного віддалення від тестерів з максимальними значеннями середньої генетичної дистанції. Прогнозували добір потенційно цінних генотипів, що увійшли до максимально віддаленої групи за значенням генетичних дистанцій по відношенню до добраних тестерів.

Рекомбінантні лінії з популяції F<sub>4</sub> та F<sub>6</sub>, що ідентифіковано як клас з високим рівнем генетичної дистанції, виявили середній ( $r \geq 0,5$ )

або високий ( $r < 0,7$ ) зв'язок з урожайністю зерна гібридів, отриманих на основі материнських ліній цього кластеру. Так, у гібридів з лінією-тестером Одеська 329 коефіцієнт кореляції між урожайністю і генетичною дистанцією РІЛ з класу з високим ступенем віддаленості (ГД > 5,000) склав за роками:  $r = 0,55 - 0,63 - 0,72$ . У гібридів з тестером Одеська 308 МВ:  $r = 0,54 - 0,67$ . Коефіцієнт добору, тобто частка добраних кращих ліній і гібридів для подальшої гібридизації і сортовипробування, складає 12–14 % від об'єму за традиційними методами селекції [13, 14].

Таким чином, кластеризація популяції і виділення класу РІЛ з високим рівнем генетичної дистанції на основі SSR-аналізу ще до проведення польового випробування дозволяє прогнозувати групу гібридів з максимальною врожайністю і значно (на 70–80 %) скорочувати обсяги сортовипробування.

## Висновки

Розроблена технологія прогнозування рівня розвитку кількісних ознак у популяціях кукурудзи на підставі їх зв'язку з ДНК-маркерами, що дозволяє генетично поліпшувати базові популяції кукурудзи і використовувати їх за вихідний матеріал для гетерозисної селекції. Кластеризація популяції і виділення класу РІЛ з високим рівнем генетичної дистанції на основі SSR-аналізу і прогнозування добору потенційно цінних генотипів, що увійшли до максимально віддаленої групи за значенням генетичних дистанцій по відношенню до добраних тестерів, дозволяє скорочувати обсяги сортовипробування. Отже, на сучасному етапі молекулярні маркери є ефективним інструментом вирішення задач селекції кукурудзи, у тому числі, проблем використання гетерозису і поліпшення якості врожаю.

*Дослідження (частково) виконано за рахунок бюджетних коштів – за фінансової підтримки Державного агентства з питань науки, інновацій та інформатизації України.*

## Література

1. Moll R. Heterosis and genetic diversity in variety crosses of maize // *Crop Sci.* – 1962. – N 2. – P. 197–198.
2. Stuber C., Goodman M. Allozyme genotypes for popular and historically important inbred lines of corn // *USDA, Agric. Res. Serv., Southern Series.* – 1983. – 16. – 28 p.
3. Smith J., Smith O. The use of morphological, biochemical, and genetic characteristics to measure distance and to test for minimum distance between inbred lines of maize (*Zea mays* L.) // *UPOV Document.* – 1989. – 18 p.
4. Charcosset A., Lefort-Buson M., Gallais A. Relationship between heterosis and heterozygosity at marker loci: a theoretical computation // *Theor. Appl. Genetics.* – 1991. – 81. – P. 571–575.
5. Guimaraes E. P., Ruane J., Schert B.D., Sonnino A., Dargie J.D. Marker – assisted selection. Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish. // *Food and agriculture organization of the united nations.* – Rome. – 2007. – 471 p.
6. Schrag T.A., Melchinger A.E. et al. Molecular marker-based prediction of hybrid performance in maize using unbalanced data from multiple experiments with factorial crosses // *Theor. Appl. Genet.* – 2009. – 118. – P. 741–751.
7. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: Колос. – 1973. – С. 156–163.
8. Зенищева Л.С. Наследуемость количественных признаков, определяющих устойчивость растений к полеганию // *С.-х. биология.* – 1968. – Вип. 3. – С. 790–794.
9. Belousov A.A., Sokolov V.M., Sivolap Y.M., Domenjuk V.P., Storcheus N.I. Heterosis of maize hybrids developed using DNA technologies // *Acta Agronomica Hungrica.* Budapest. – 2006. – P. 391–396.
10. Доменюк В., Белоусов А., Сиволап Ю. ДНК-маркирование количественных признаков кукурузы // *Цитология и генетика.* – 2002. – № 6. – С. 12–19.
11. Доменюк В., Вербицкая Т., Белоусов А., Сиволап Ю. Маркерный анализ количественных признаков кукурузы при помощи ISSR-ПЦР // *Генетика.* – 2002. – 38, № 9. – С. 1–9.
12. Доменюк В.П., Белоусов А.О., Сиволап Ю.М. Добір за ДНК-маркерами локусів кількісних ознак в селекції кукурудзи // *Вісник Харківського національного аграрного університету.* – 2003. – № 3 (2). – С. 87–91.
13. Букреева Н.І. Букреева Н.І., Белоусов А.О., Сиволап Ю.М. Кластерно-кореляційний аналіз популяцій рекомбінантних ліній і гібридів кукурудзи на основі SSR-ПЛР // *Вісник ОНУ.* – 2011. – 16, вип. 6. – С. 23–33.
14. Белоусов А.О., Сиволап Ю.М., Соколов В.М., Букреева Н.І. Спосіб ДНК-прогнозування добору батьківських компонентів для отримання високопродуктивних гібридів кукурудзи // Патент на корисну модель № 72116. Заявник – Південний біотехнологічний центр. Отримано 10.08.12. Бюл. № 15.

**BUKREYEVA N.I., DOMENYUK V.P., BELOUSOV A.A., SOKOLOV V.M., SIVOLAP YU.M.**

*Plant Breeding and Genetics Institute, National Center for Plant Breeding and Cultivar Science, National Academy of Agrarian Sciences,  
Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopolskaya road, 3, e-mail: natastor@rambler.ru*

### **MOLECULAR MARKERS BASED PREDICTION OF HETEROSIS IN MAIZE**

**Aims.** Selection procedure based on the use of molecular markers, the so-called marker-assisted selection (MAS), has advantages over conventional selection methods, since MAS uses close associations between genetic markers and loci of important agronomic traits. **Methods.** The parental material, that is, the maize lines GK26 and Mo17, the segregating population (GK26 x Mo17) F<sub>2</sub> – F<sub>6</sub> and testers (used as pollinators on hybridization plots with parental recombinant inbred lines (RILs)) Od308MV, Od221MV and Od329, were combined with ISSR-, RAPD-, SSR-analysis of genetic diversity to characterize the populations. **Results.** Parental lines GK 26 and Mo 17 and lines-testers of Od 221 MB, Od 308 MB, Od 329 polymorphism was analyzed by SSR-PCR and genotyping RILs populations F<sub>4</sub>, F<sub>6</sub> was conducted. The cluster and correlation analyses of RIL populations and dependence between the genetic distance and hybrid performance levels were determined. DNA-based prediction breeding of parental genotypes for creating of testcross with high performance using microsatellite marker information was simulated. The results allowed to predict high performance hybrids group and reduce analyzed samples on 70–80 %. **Conclusions.** The technology of prediction based on association with DNA markers and quantitative traits in maize populations was created. It was allowed to improve the genetic base of maize populations and their use for source material for heterosis breeding. Molecular markers are an effective tool for solving problems of breeding, including the use of heterosis problems and improve the quality of the crop.

**Key words:** RILs and hybrids of maize, SSR-analysis, genetic polymorphism, DNA-based prediction.

**УДК 633.522:631.535.663.99**

**ВИРОВЕЦ В.Г.<sup>1,2</sup>, ЛАЙКО И.М.<sup>1</sup>, ГОРШКОВА Л.М.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Опытная станция лубяных культур Института сельского хозяйства Северо-Востока НААН Украины,*

*Украина, 41400, Сумская обл., г. Глухов, ул. Терещенков, 45, e-mail: ibc@sm.ukrtel.net*

<sup>2</sup> *Глуховский национальный педагогический университет имени Александра Довженко,*

*Украина, 41400, Сумская обл., г. Глухов, ул. Киево-Московская, 24, e-mail: gdpu@sm.ukrtel.net*

### **ПУТИ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ НАРКОТИЧЕСКОЙ ОПАСНОСТИ ДИКОЙ КОНОПЛИ**

Наркомания (гр. narke – оцепенение, болезненное влечение) – широко распространенное в мире явление, которое возникло вследствие пристрастия к употреблению наркотиков (гр. narkotikos – приводящий в оцепенение, одурманивающий) – группы веществ растительного происхождения или искусственно созданных химическим путем, которые вызывают болеуспокаивающее или снотворное действие. Злоупотребление этими веществами приводит к наркомании. Сейчас известно целый ряд культур, среди которых наиболее популярными являются мак, конопля, кока, эфедр, левзея (маралий корень), мексиканский кактус-пейота, имбирь, некоторые грибы (мухоморы) и др. – это лишь маленькая частица огромного арсенала природных химических соединений, способных воздействовать на человеческий и животный

организмы.

Из известных органических природных источников, которые оказались пригодными для наркотического удовлетворения, была использована такая сельскохозяйственно значима широко известная волокнистая культура – конопля, основное назначение которой издавна заключалось в удовлетворении потребностей населения в изделиях ручного, а позже ткацкого производства [1, 2].

На основании научных поисков исследователи утверждают, что в любом человеческом или животном организме вырабатываются специфические вещества – «собственные наркотики» – анандамиды, что в переводе с санскрита означает «радость или экстаз». Профессоры Рафаэль Мешулам и Ихелем Гаони раскрыли механизм действия наркотиков на организм. С большим